

Verfahren und Vorrichtung zur Aufnahme mikroskopischer Bilder

Beschreibung

Die Erfindung befasst sich mit der Erzeugung mikroskopischer Bilder durch Scannen einer Messzelle mit einem optischen Sensor. Vorzugsweise handelt es sich bei der Messzelle um eine Durchflussküvette. Zur Vereinfachung ist nachfolgend nur letztere genannt.

- 5 Die innovatis AG entwickelt, produziert und vertreibt Geräte zur Partikel- und Zellanalyse. Zur Analyse der Zelldichte, zur Klassifizierung in lebende und tote Zellen und zur Bestimmung von Objektdurchmesser und Objektgeometrie werden Bilder von Partikeln oder Zellen aufgenommen. Die Objekte befinden sich während der Analyse in einer optisch geeigneten Küvette in Suspension.

10

Stand der Technik

- 15 Die bisher auf dem Markt bestehenden, automatischen Systeme zur Untersuchung von Dichte, Viabilität und Durchmesser zellhaltiger Suspensionen biologischen Ursprungs basieren auf der Messung des elektrischen Widerstandes, der elektrischen Kapazität, der Laserdiffraktometrie oder der optischen Bildanalyse.

- 20 Die Auswertung von Objekten mittels optischer Bildaufnahme und einer digitalen Bildanalyse wurde bisher durch die Verwendung eines Mikroskops realisiert, wobei eine Mikroskop-Optik zur Vergrößerung der teilweise nur wenige Mikrometer kleinen Objekte benutzt wird. Das so erzeugte Bild wird mit einer Digitalkamera aufgenommen und von speziellen Computer-Programmen ausgewertet.

- 25 Als Beispiel für das herkömmlich angewendete, automatische Verfahren ist das Cedex System (innovatis AG) zu nennen. Dieses System arbeitet mit einer angepassten Mikroskop-Optik, die es ermöglicht, Zelldichten und Viabilitäten von Suspensionszellen zu

bestimmen. Nach demselben Prinzip wird eine Analyse der Zellkultur durch das nachfolgend entwickelte Vi-CELL System (Beckman Coulter Inc.) durchgeführt. Das zugrundeliegende Verfahren ist durch drei Parameter limitiert, die es nicht erlauben unterhalb einer bestimmten Objektgröße zu detektieren:

5

1. Tiefenschärfe

Um mit Hilfe einer Mikroskop-Optik Objekte in einer Durchflussküvette aufnehmen zu können, müssen über die gesamte Küvettenhöhe hin die Objekte hinreichend scharf abgebildet werden.

15

2. Küvettenhöhe

Die Küvette muss so groß sein, dass genügend Objekte für eine statistische Signifikanz aufgenommen werden, und gleichzeitig klein genug, um die Tiefenschärfe über den gesamten Bereich der Küvettenhöhe zu ermöglichen.

20

3. Objektanzahl

Durch die Methode der Bildaufnahme ist es nicht möglich unterhalb einer Objektdichte von 5×10^4 Objekten pro mL Suspension zu detektieren, ohne den Bereich der statistischen Signifikanz zu verlassen.

Da die Tiefenschärfe proportional zu $1/NA^2$, die optische Auflösung proportional zu $1/NA$ ist (mit NA = Numerische Apertur), nimmt bei Verkleinerung der Auflösung um detailreichere Bilder zu erhalten die Tiefenschärfe quadratisch dazu ab.

30

Bei dem herkömmlich angewendeten Verfahren wird die Messküvette mit dem Probenmaterial komplett gefüllt und mit der Mikroskop-Optik eine Tiefenschärfe eingestellt, die sich über den gesamten Bereich der Küvettenhöhe erstreckt. Um den

Bereich der statistischen Signifikanz zu erreichen, müssen entsprechend viele Bilder der Probe durch sukzessive Befüllung der Küvette aufgenommen werden.

5 In der EP 1 329 706 A1 wird ein Verfahren beschrieben, bei dem sich die Probe über die gesamte Küvettenhöhe erstreckt. Die Auflösung des Systems und somit die minimal erforderliche Größe der zu analysierenden Partikel ist beschränkt durch die Tiefenschärfe, die erforderlich ist, um die Probe über die gesamte Küvettenhöhe scharf abzubilden. Die digitale Bildaufnahme erfolgt mittels Kamera, nicht durch einen Scanner. Dieses Patent aus dem Jahr 2003 beschreibt die Funktionsweise des oben genannten Cedex Systems, 10 welches bereits 1997 veröffentlicht wurde (Animal Cell Technology, Proceedings of the 14th Meeting of ESACT, Kluwer Academic Publishers, 1997, Seite 301-305).

15 In der DE 41 16 313 C2 erfolgt die Sedimentation mehrere Proben gleichzeitig durch eine Zentrifuge. Ziel des Verfahrens ist die Bestimmung elastomechanischer Eigenschaften von Sedimenten aus Suspensionen und Emulsionen.

In der US 6,141,624 A wird beschrieben, wie eine ausreichende Probenmenge zum Nachweis unterschiedlicher Partikel mittels einer Durchflussküvette automatisch zur Verfügung gestellt werden kann.

20 Aufgabe

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es insbesondere, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Aufnahme von Bildern im mikroskopischen Bereich zu schaffen, durch die 25 eine hohe optische Auflösung erzielbar ist. Weitere Aufgabenstellungen ergeben sich aus den insgesamt dargestellten Lösungen und Vorteilen.

Erfindung

30 Die Merkmale der Erfindung sind in den unabhängigen Ansprüchen wiedergegeben. Weitere Merkmale der Erfindung bzw. vorteilhafte Weiterbildungen derselben sind in den Unteransprüchen und in der Beschreibung genannt.

Erfindungsgemäß ist insbesondere die Kombination der folgenden Methoden vorgesehen:

- Einbringen einer Probe in eine Messzelle, insbesondere in eine Durchflussskivette
- Sedimentation der Probe
- 5 - Digitale Bildaufnahme mittels Scanner
- Analysieren der Partikel in der Probe durch Auswertung der Bildaufnahme

Dadurch unterscheidet es sich von den genannten herkömmlichen Verfahren.

- 10 An Stelle einer Mikroskop-Optik mit Autofokus-Mechanik und -Elektronik sowie einer Digitalkamera (gegebenenfalls mit Framgrabber) wird ein Scanner verwendet, der insbesondere alle Funktionen der zuvor genannten herkömmlichen Komponenten ersetzen kann.
- 15 Mit Hilfe des Scanners kann, im Vergleich zum herkömmlichen Verfahren, in einem kurzen Zeitraum mehr Bilddatenmaterial aufgenommen werden. Ist die Probenkammer entsprechend groß, so hat man einen enormen Zeitgewinn, der es erlaubt, die Objekte absinken zu lassen, und in einem geringeren Fokusbereich zu agieren, und damit die optische Auflösung zu erhöhen. Mit diesem Verfahren können dann viel kleinere Objekte
- 20 oder Partikel analysiert werden.

Kurzbeschreibung der Figuren:

- 25 Abbildung 1: Schemazeichnung des herkömmlichen Bildaufnahmeverfahrens
Abbildung 2: Schemazeichnung des Scanner Bildaufnahmeverfahrens
Abbildung 3: Schemazeichnung Durchlicht-Verfahren
Abbildung 4: Schemazeichnung Dunkelfeld-Verfahren
Abbildung 5: Schemazeichnung Fluoreszenz-Verfahren

30

Abbildungen 1 und 2 zeigen schematisch das herkömmliche und das neue Bildaufnahmeverfahren. Beide Bilder zeigen jeweils eine Durchflussskivette (23) mit

optischer Achse (21) und Durchflussrichtung (22). Der senkrechte Doppelpfeil zeigt den für eine optimale Bildaufnahme benötigten Tiefenschärfebereich an.

5 Da ein reziprok quadratischer Zusammenhang besteht, wird bei dem neuen Verfahren die höhere optische Auflösung bei geringerer Tiefenschärfe gewählt, um Bilder des Probenmaterials in der Durchflussküvette aufzunehmen. Dies wäre beim herkömmlichen Verfahren nur in einem nicht vertretbaren Zeitrahmen durchführbar.

10 Das von der erfindungsgemäßen Vorrichtung gelieferte Bilddatenmaterial kann nachfolgend einer Bilddatenanalyse zugeführt werden.

15 Der wesentliche Vorteil der Vorrichtung ist es, dass eine hohe optische Auflösung einer Partikel- oder Zellsuspension erzielt wird. Dies wird u.a. durch Absinken der Objekte auf eine optische Ebene bei gleichzeitig hohem Probenvolumen erreicht. Das Absinken der Objekte kann durch Sedimentation oder weitere geeignete Verfahren erfolgen.

Die unterschiedlichen Techniken zur Ansammlung von Objekten innerhalb der Messküvette können sein:

- Adhäsion
- 20 - Repulsion
- Elektrische Wirkung
- Magnetische Wirkung
- Gravitation
- Zentrifugation
- 25 - Auftrieb
- Immobilisation
- Kopplung

sowie Kombinationen aus diesen Methoden.

30 Die Vorrichtung eignet sich für mikroskopische Aufnahmen unter Auflicht, Durchlicht, Fluoreszenz, Phasenkontrast, Dunkelfeld und Licht im sichtbaren und nicht-sichtbaren Bereich sowie alle daraus möglichen Kombinationen. Es kann des weiteren die dem aktuellen Stand der Technik entsprechenden weiteren Kontrastverfahren beinhalten.

Die zu untersuchenden Proben können Partikellösungen oder Zellmaterial biologischen Ursprungs sein, das sowohl ungefärbt als auch gefärbt untersucht werden können.

Es wird eine Bestimmung der Konzentration und Viabilität zellhaltiger biologischer Proben einer Kultursuspension sowie Apoptoseverhalten, Produktkonzentration und Analyse intrazellulärer Kompartimente und Stoffwechselvorgänge durchgeführt.

Es werden darüber hinaus folgende Parameter bestimmt: Durchmesser einzelner Objekte, Aggregationsrate, Geometrie, Anzahl der gezählten Objekte und Abweichung vom Mittelwert sowie Oberflächenbeschaffenheit und Morphologie.

Die Ergebnisdaten und Parameter werden mittels eines Computer-Verfahrens aus den aufgenommenen Bilddaten ermittelt.

Basis der Messung ist ein Verfahren (Mikroskopieverfahren und andere), bei dem die partikel-/zellhaltige Probe durch eine Küvette fließt (Durchflussküvette). Es werden mit einem optischen Zeilen- oder Flächensensor digitale Bilder der Probe in der Küvette aufgenommen, die dann mit einem Verfahren zur optischen Bildanalyse ausgewertet werden.

Die prinzipielle Idee ist es, eine Vorrichtung (Scanner) so zu konstruieren, dass er die entsprechende Auflösung liefert, um auch im Mikrometer-Maßstab qualitativ hochwertig abbilden zu können. Dieses wird durch eine veränderte Optik, angepasste Autofokusverfahren und eine modifizierte Mechanik erreicht.

Die Bildaufnahme erfolgt in diesem Fall entweder durch eine Bewegung der Scannereinheit relativ zur Partikelprobe oder durch eine Bewegung der Partikelprobe relativ zur Scannereinheit. Dazu befindet sich die Küvette senkrecht im optischen Pfad.

Die Ausleserate des optischen Sensors wird mit der Verfahrensgeschwindigkeit synchronisiert, so dass ein oder mehrere Bilder entstehen.

Im Folgenden wird ein möglicher Ablauf des Verfahrens aufgelistet und erläutert:

- Einbringen der Probe in die Messküvette
- Absinken der Objekte der Probe in der Lösung
Ansammlung der Objekte in einer optischen Ebene. Beispielhaft wird dieser Vorgang im Weiteren als Sedimentation bezeichnet.

- 5 - Scannen
Digitale Bildaufnahme unter Berücksichtigung eines ausreichenden Volumens des Probenvolumens, um mit einem Bild ein statistisch repräsentatives Ergebnis erzielen zu können (siehe auch Abschnitt „Stand der Technik“).
- 10 - Analyse des Bilddatenmaterials
Speziell angepasste Analyse des Bilddatenmaterials zur Ergebnisermittlung.
- 10 - Anzeige und Export der Analysedaten
Benutzerfreundliche Präsentation der Ergebnisdaten als Zahlenwerte sowie als grafische Anzeige.

- 15 Mit diesem Verfahren ist es möglich, dass einzelne Objekte analysiert werden. Für den Fall der Analyse von Zellmaterial biologischen Ursprungs kann eine Analyse von Morphologie, Oberflächenbeschaffenheit etc. erfolgen.

- 20 Der durch die Integration einer Scannereinheit zur optischen Bilderfassung erzielte Nutzen ist gegeben durch die Vergrößerung des Detektionsbereichs. Eine entsprechende Scanneroptik kann von der Auflösung her deutlich geringere Objektdurchmesser analysieren, als es mit dem heutigen Stand der Technik möglich ist. Es können zusätzliche Informationen über Struktur und Morphologie der Objekte gewonnen werden.

- 25 Durch die Methode der Sedimentation kann es nun erstmals ermöglicht werden, dass alle Objekte einer Probe auf einmal aufgenommen und analysiert werden.

- 30 Da durch geeignete Wahl der Messküvette pro Volumeneinheit eine größere Objektanzahl ausgewertet werden kann, wird für das zur Anmeldung vorliegende Verfahren ein geringeres Probenvolumen benötigt, als es bei den Systemen aktueller Bauart üblich ist.

Beispielbeschreibung

Dem beschriebenen Verfahren liegen mikroskopische Aufnahmen zu Grunde, die unter unterschiedlichen Bedingungen generiert wurden: Auflicht, Durchlicht, Fluoreszenzlicht, Phasenkontrast, weitere Kontrastverfahren, Dunkelfeld und Licht im sichtbaren und nicht-sichtbaren Bereich, sowie alle daraus möglichen Kombinationen.

5

Als Beispiel dazu sind im Folgenden mehrere mikroskopische Aufnahmeverfahren beschrieben. Für die Realisierung des Verfahrens können diese und weitere lichtgebende Verfahren miteinander kombiniert werden.

- 10 Die zu untersuchende Probenlösung / Suspension befindet sich in einer Küvette als Messzelle. Nach dem Einbringen des Zellmaterials wird gewartet, bis die zu untersuchenden Objekte auf den Küvettenboden sedimentieren. Dann wird ein Bild aufgenommen. Während der Bildaufnahme bewegen sich Küvette und Scanner relativ zueinander. Das heißt, dass sich entweder die Partikelprobe relativ zur Scannereinheit
- 15 oder die Scannereinheit relativ zur Partikelprobe bewegt. Der Bereich der Küvette, der dabei aufgenommen wird, ist variabel.

Beispiel (a) Durchlicht-Verfahren

20

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung für Durchlicht-Aufnahmen ist in Abb. 3 dargestellt und wird nachfolgend beschrieben.

- 25 Der optische Sensor 8 befindet sich auf der einen Seite der Küvette 6, die Lichtquelle 1 auf der gegenüberliegenden Seite. Für die Bündelung der Lichtstrahlen und zur Vergrößerung der Abbildung werden Beleuchtungsoptik 2, 3, 4, 5 und Objektiv 7 in den optischen Pfad eingebracht. Die Beleuchtungsoptik besteht aus Kollektorlinse 2, Leuchtfeldblende 3, Kondensorblende 4 und Kondensoroptik 5. Zusätzlich können mehrere Filter in den optischen Pfad eingebracht werden. Zur Beschickung der Küvette 6
- 30 mit der Probenlösung wird diese durch die Einlasskapillare 9 zugeführt und durch die Auslasskapillare 10 abgeführt. Die Bildaufnahme erfolgt entweder durch Bewegung der Scannereinheit relativ zur Partikelprobe 11 oder durch Bewegung der Partikelprobe relativ zur Scannereinheit 12, welche die Bauteile 1-5 und 7-8 aufweist.

Beispiel (b) Dunkelfeldverfahren

Der optische Sensor 8 befindet sich auf der einen Seite der Küvette 6, die Lichtquelle 1 auf der gegenüberliegenden Seite. Für die Bündelung der Lichtstrahlen und zur Vergrößerung der Abbildung werden Beleuchtungsoptik, bestehend aus Kollektorlinse 2, Leuchtfeldblende 3 und Dunkelfeldblende 15, Kondensoroptik 5 und Objektiv 7 in den optischen Pfad eingebracht. Zusätzlich können mehrere Filter in den optischen Pfad eingebracht werden. Zur Beschickung der Küvette 6 mit der Probenlösung wird diese durch die Einlasskapillare 9 zugeführt und durch die Auslasskapillare 10 abgeführt. Die Bildaufnahme erfolgt entweder durch Bewegung der Scannereinheit relativ zur Partikelprobe 11 oder durch Bewegung der Partikelprobe relativ zur Scannereinheit 12, welche auch hier die Bauteile 1-5 und 7-8 aufweist.

Beispiel (c) Fluoreszenz-Verfahren

Für Aufnahmen von Fluoreszenz-Bildern im Auflicht-Verfahren wird das von der Probe kommende Licht zum optischen Sensor geleitet, nachdem es den Strahlenteiler 3 passiert hat, der das Licht zur Probenbeleuchtung in den optischen Pfad einkoppelt.

Der optische Sensor 8 befindet sich auf einer optischen Achse mit der Küvette 6. Die Strahlen der Lichtquelle 1 werden mittels Beleuchtungsoptik gebündelt und kollimiert, bevor sie durch den Strahlenteiler 13 über das Objektiv 4 die Probe in der Küvette 6 beleuchten. Die Beleuchtungsoptik besteht aus Kollektorlinse 2 und Leuchtfeldblende 3 sowie weiteren Linsen 5 und einer weiteren Blende 4. Zusätzlich können entsprechende Filter 14 in den optischen Pfad eingebracht werden. Zur Beschickung der Küvette 6 mit der Probenlösung wird diese durch die Einlasskapillare 9 zugeführt und durch die Auslasskapillare 10 abgeführt. Die Bildaufnahme erfolgt entweder durch Bewegung der Scannereinheit relativ zur Partikelprobe 11 oder durch Bewegung der Partikelprobe relativ zur Scannereinheit 12.

Beispiel (d)

Es sollen Anzahl und Viabilität kleiner Partikel, z.B. suspendierter Blutzellen oder Hefen, in einer Probe bestimmt werden. Es liegt ein Probenvolumen von etwa 500 μl vor. Zur Bestimmung der Viabilität wird die Probe eingefärbt.

5

Die Probe wird in die Küvette verbracht, wo die Partikel in der Probe eine bestimmte Zeit lang sedimentieren. Die einzuhaltende Sedimentationszeit hängt vom jeweiligen Sedimentationsverhalten der Partikel in der jeweiligen Suspension, d.h. Dichte der Partikel und Viskosität der Suspension, der Küvettenhöhe sowie der Tiefenschärfe der Bildaufnahmeoptik ab.

10

Nach Ablauf der Sedimentationszeit befinden sich ein repräsentativer Anteil der Partikel auf bzw. in einer durch die optischen Eigenschaften des Systems zulässigen Höhe über dem Küvettenboden, so dass eine ausreichend scharfe Abbildung aller Partikel möglich ist. Zu diesem Zeitpunkt sind außerdem die Partikelbewegungen in Fließrichtung und in Sedimentationsrichtung soweit abgeklungen, dass die verzerrungsfreie Bildaufnahme mit einem Zeilensensor (Scanner) erfolgen kann.

15

Jetzt erfolgt die digitale Bildaufnahme der gesamten Probe in einem Schritt. Die so gewonnenen Bilddaten werden digital aufbereitet und mit bekannten Verfahren analysiert. Als Ergebnis erhält man Partikelkonzentration und Viabilität sowie weitere Merkmale der Partikel, wie z.B. den Durchmesser.

20

25

INS-37-WO

21. Dezember 2004/7521

Bezugszeichenliste

5

- | | |
|----|--------------------|
| 1 | Lichtquelle |
| 2 | Kollektorlinse |
| 3 | Leuchtfeldblende |
| 4 | Kondensorblende |
| 5 | Kondensoroptik |
| 6 | Küvette |
| 7 | Objektiv |
| 8 | Sensor |
| 9 | Einlasskapillare |
| 10 | Auslasskapillare |
| 11 | Partikelprobe |
| 12 | Scannereinheit |
| 13 | Strahlenteiler |
| 14 | Filter |
| 15 | Dunkelfeldblende |
| 21 | Achse |
| 22 | Durchflussrichtung |
| 23 | Durchflussküvette |

INS-37-WO

21. Dezember 2004/7521

. Patentansprüche

1. Verfahren zur Aufnahme mikroskopischer Bilder mit hoher optischer Auflösung von in einer Flüssigkeit suspendierten Partikeln oder Organismen, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Suspension in eine Messzelle, insbesondere Durchflussküvette, eingebracht wird und das Bild der Suspension von einem optischen Sensor aufgenommen wird, wobei sich
5 optischer Sensor und Messzelle relativ zueinander bewegen und der Inhalt der Messzelle dabei ganz oder teilweise abgebildet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass sich der Sensor gegebenenfalls mit optischen Elementen und einer Lichtquelle entlang der Messzelle
10 bewegt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass sich die Messzelle entlang des Sensors und gegebenenfalls der optischen Elemente und der Lichtquelle
15 bewegt.

4. Verfahren nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Messzelle (Küvette) durch die Bewegung optischer Elemente ganz oder teilweise auf den optischen Sensor abgebildet wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass nach dem Einbringen der Suspension die enthaltenen Partikel zunächst auf den Boden der Messzelle oder in einen Bereich oberhalb des Bodens absinken und damit nur noch ein Teil der Messzelle die zu untersuchenden Partikel oder Organismen enthält, so dass dieser Bereich mit einer hohen optischen Auflösung
20 abgebildet und vom optischen Sensor erfasst werden kann.

6. Verfahren nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass nach dem Einbringen der Suspension die enthaltenen Partikel zunächst zur oberen Begrenzungsfläche der Messzelle oder in einen Bereich unterhalb

der oberen Begrenzungsfläche aufsteigen und damit nur noch ein Teil der Messzelle die zu untersuchenden Partikel oder Organismen enthält, so dass dieser Bereich mit einer hohen optischen Auflösung abgebildet und vom optischen Sensor erfasst werden kann.

- 5 7. Verfahren nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Absinken oder Aufsteigen der Objekte innerhalb der Küvette durch unterschiedliche biologische, physikalische oder chemische Techniken sowie durch Sedimentation oder Auftrieb erfolgen kann.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Lichtquelle und gegebenenfalls Blenden- und Linsensysteme (Kondensor) auf einer Seite der Messzelle, Objektiv (und gegebenenfalls Blendensysteme) und der optische Sensor auf der anderen, gegenüberliegenden Seite der Messzelle angeordnet sind (Durchlichtbeleuchtung).
- 15 9. Verfahren nach Anspruch 1 oder einem der weiteren Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Lichtquelle und gegebenenfalls Blenden- und Linsensysteme (Kondensor) auf derselben Seite der Messzelle angeordnet sind, wie Objektiv (und gegebenenfalls Blenden) und der optische Sensor (Auflichtbeleuchtung).
- 20 10. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Durchlichtbeleuchtung als Hellfeldbeleuchtung ausgelegt wurde.
- 25 11. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Durchlichtbeleuchtung als Dunkelfeldbeleuchtung ausgelegt wurde.
12. Verfahren nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Durchlichtbeleuchtung als Phasenkontrastbeleuchtung mit den bekannten Phasenkontrastverfahren ausgelegt werden kann.
- 30 13. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Auflichtbeleuchtung als Fluoreszenzbeleuchtung mit den bekannten Fluoreszenzverfahren ausgelegt werden kann.

14. Verfahren nach Anspruch 10,11 oder 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine geeignete Lichtquelle oder Einbringen eines oder mehrerer geeigneter Filter es ermöglicht, die Objekte in der Küvette mit einer definierten spektralen Intensitätsverteilung des einfallenden Lichtes zu beleuchten (Beleuchtungsseite).

5

15. Verfahren nach Anspruch 10, 11, 12, 13 oder 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine geeignete Lichtquelle oder Einbringen eines oder mehrerer geeigneter Filter es ermöglicht, den optischen Sensor mit einer definierten spektralen Intensitätsverteilung des einfallenden Lichtes zu beleuchten (Nachweisseite).

10

16. Verfahren nach Anspruch 10, 11, 12, 13 oder 14 **dadurch gekennzeichnet**, dass die in den Ansprüchen genannten Beleuchtungsarten auch in den daraus resultierenden möglichen Kombinationen angewendet werden können.

15

17. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die zu untersuchende Suspension mit Farbstoffen versetzt ist.

18. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass alle oder ein Teil der eingesetzten Filter automatisch oder manuell gewechselt werden.

20

19. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass alle oder ein Teil der eingesetzten Objektive automatisch oder manuell gewechselt werden.

25

20. Vorrichtung zur Aufnahme mikroskopischer Bilder mit hoher optischer Auflösung von in einer Flüssigkeit suspendierten Partikeln oder Organismen, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Suspension in eine Messzelle, insbesondere Durchflussküvette, eingebracht wird und das Bild von einem optischen Sensor aufgenommen wird, wobei optischer Sensor und Messzelle relativ zueinander bewegbar und der Inhalt der Messzelle dabei ganz oder teilweise abbildbar ist.

30

21. Vorrichtung nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Lichtquelle und gegebenenfalls Blenden- und Linsensysteme (Kondensor) auf einer Seite der Messzelle, Objektiv (und gegebenenfalls Blendensysteme) und der optische Sensor auf der anderen, gegenüberliegenden Seite der Messzelle angeordnet sind (Durchlichtbeleuchtung).

22. Vorrichtung nach Anspruch 20 oder 21, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Lichtquelle und gegebenenfalls Blenden- und Linsensysteme (Kondensor) auf derselben Seite der Messzelle angeordnet sind, wie Objektiv (und gegebenenfalls Blenden) und der optische Sensor (Auflichtbeleuchtung).
- 5

Abbildung 1

Schemazeichnung des herkömmlichen Bildaufnahmeverfahrens

5

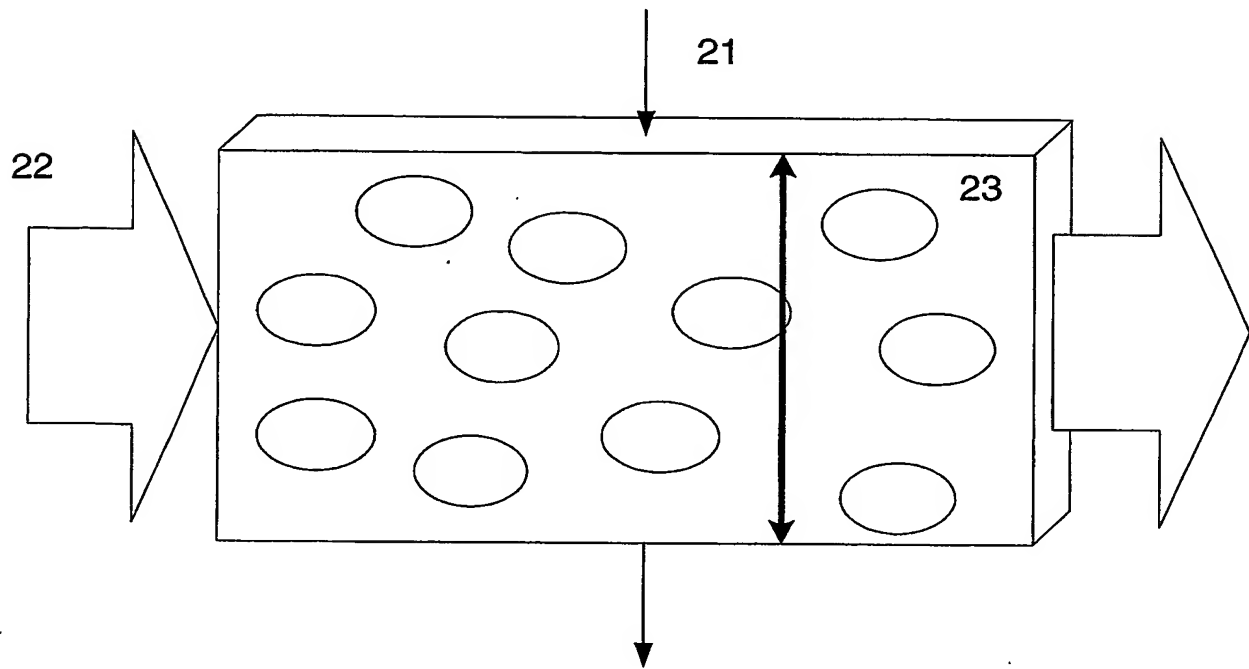


Abbildung 2

Schemazeichnung des Scanner Bildaufnahmeverfahrens

5

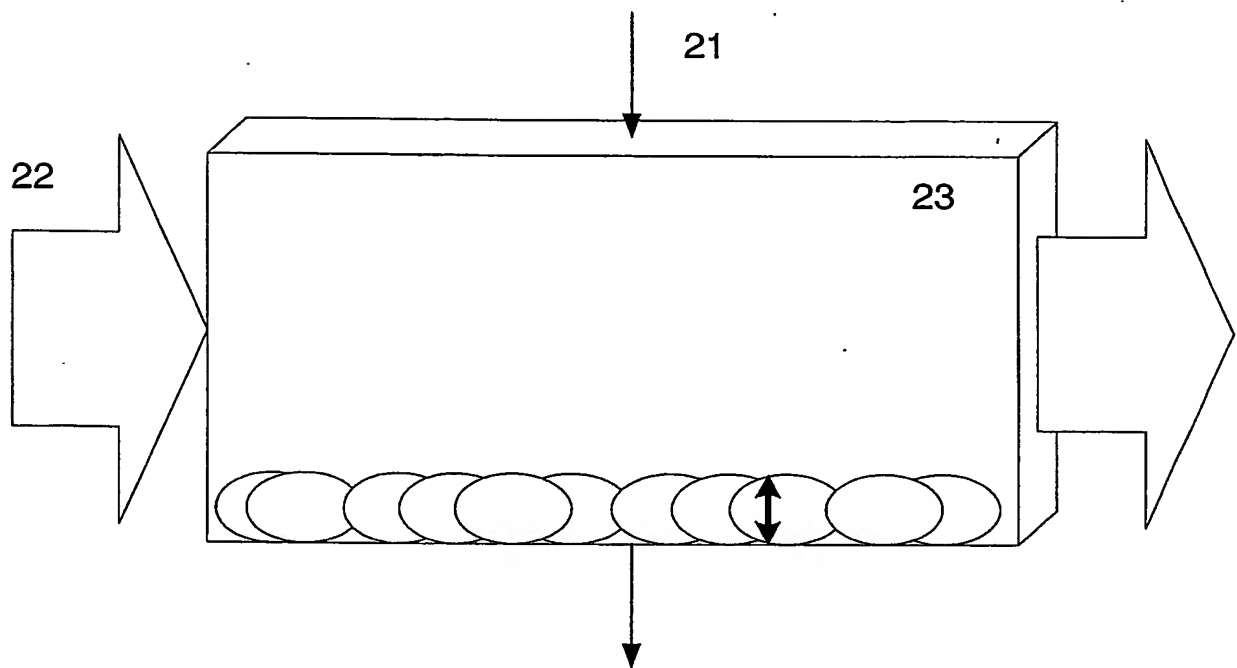


Abbildung 3

Schemazeichnung Durchlicht-Verfahren

5

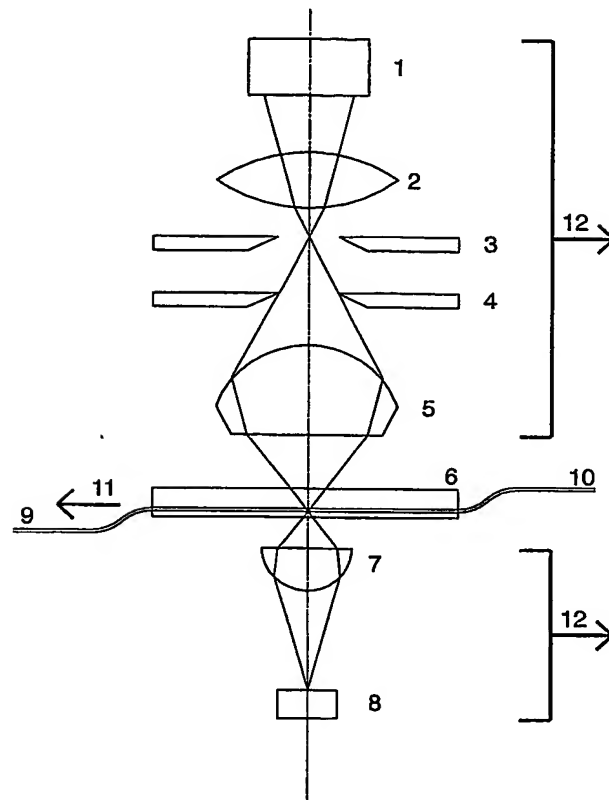


Abbildung 4

Schemazeichnung Dunkelfeld-Verfahren

5

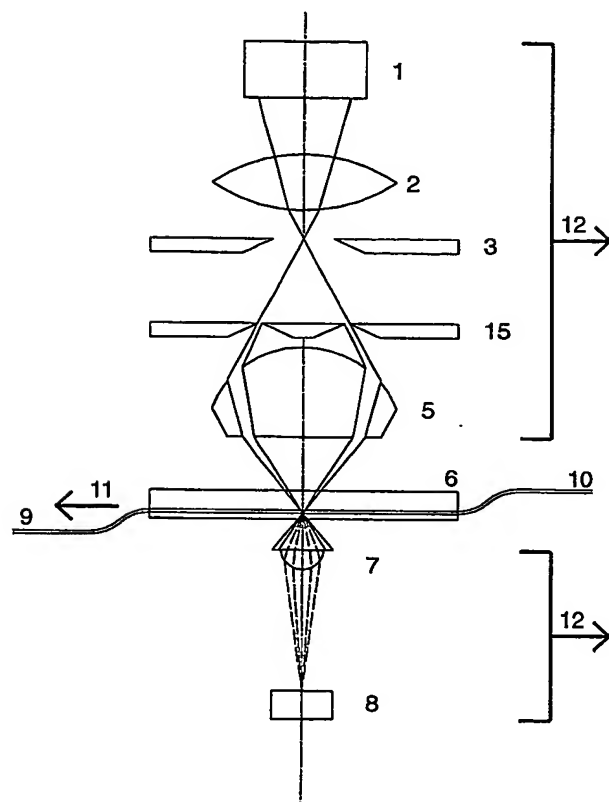
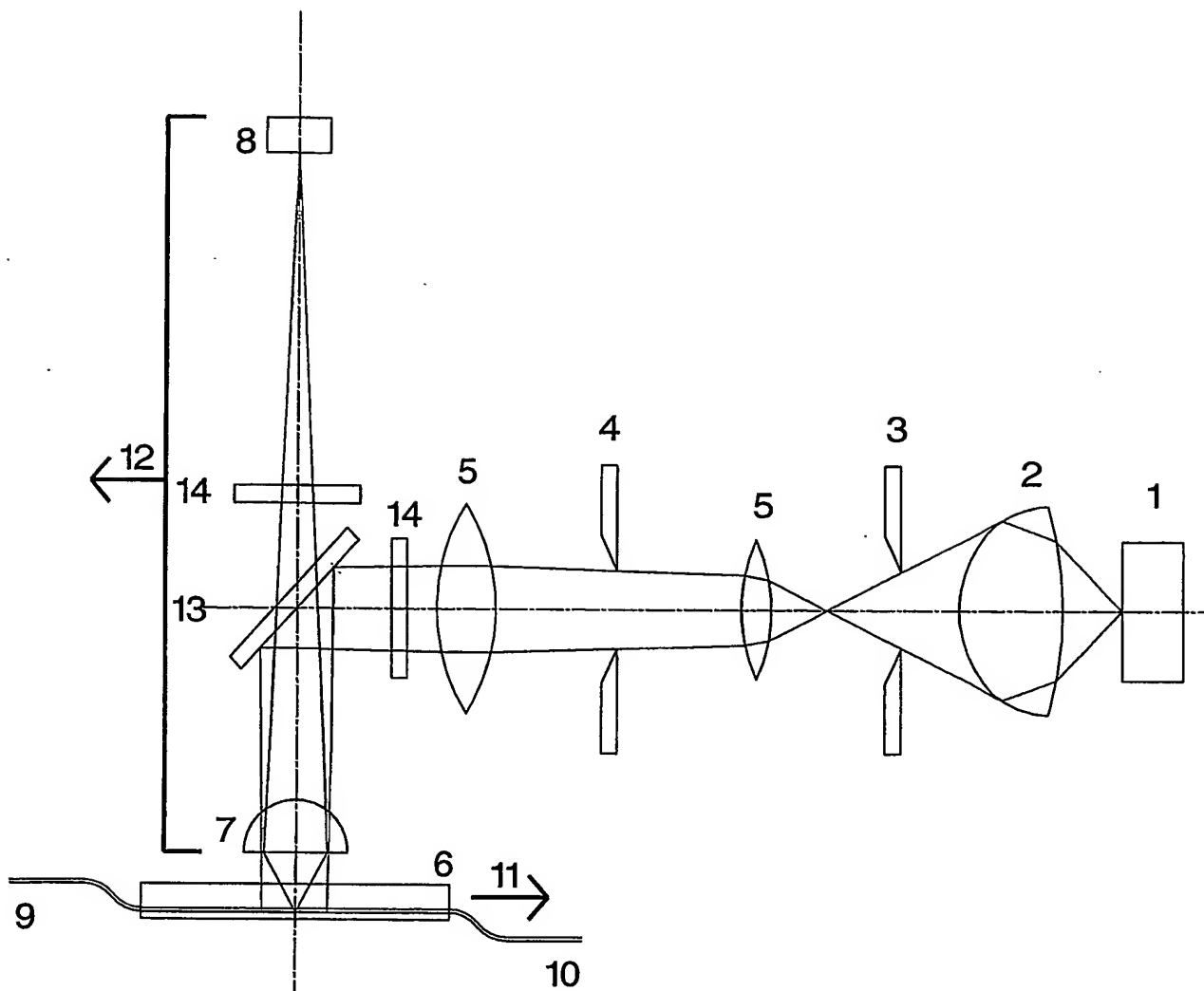


Abbildung 5

Schemazeichnung Fluoreszenz-Verfahren

5



10

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/014542

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N15/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRINKMANN MARLIES ET AL: "New technologies for automated cell counting based on optical image analysis 'The Cellscreen'." CYTOTECHNOLOGY, vol. 38, no. 1-3, 2002, pages 119-127, XP002328794 ISSN: 0920-9069	1, 3, 5, 8-22
Y	abstract; figure 1	2, 4
Y	US 2003/092058 A1 (SPAULDING GLENN F) 15 May 2003 (2003-05-15) paragraphs '0011!', '0018!', '0024!'; figure 1	2, 4
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 May 2005

Date of mailing of the international search report

01/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/014542

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 319 468 B1 (SHEPPARD, JR. NORMAN F ET AL) 20 November 2001 (2001-11-20)	1,7,20
Y	column 1, lines 38-53 column 5, line 66 - column 6, line 67 column 9, lines 26-46 column 14, lines 44-53; figure 6A	5,6
Y	YANG J ET AL: "CELL SEPARATION ON MICROFABRICATED ELECTRODES USING DIELECTROPHORETIC/GRAVITATIONAL FIELD-FLOW FRACTIONATION" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, vol. 71, no. 5, 1 March 1999 (1999-03-01), pages 911-918, XP000825768 ISSN: 0003-2700 page 913, right-hand column, paragraph 2 - page 915, left-hand column, paragraph 2; figure 2	5,6
A	WO 02/04924 A (INNOVATIS GMBH; BITTNER, CHRISTOPH) 17 January 2002 (2002-01-17) page 1, column 34 - page 2, column 24 page 6, columns 13-21	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/014542

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003092058	A1	15-05-2003	NONE	
US 6319468	B1	20-11-2001	US 6143247 A	07-11-2000
			US 6319469 B1	20-11-2001
			US 2004142494 A1	22-07-2004
			US 2002076804 A1	20-06-2002
			US 2005069913 A1	31-03-2005
			US 2002137218 A1	26-09-2002
			AU 5895898 A	17-07-1998
			WO 9828623 A1	02-07-1998
			AU 5386996 A	23-10-1996
			CA 2217572 A1	10-10-1996
			EP 0827511 A1	11-03-1998
			JP 11504316 T	20-04-1999
			WO 9631537 A1	10-10-1996
			US 5891341 A	06-04-1999
WO 0204924	A	17-01-2002	DE 10033268 A1	07-02-2002
			AT 286247 T	15-01-2005
			AU 8393401 A	21-01-2002
			CN 1441899 A ,C	10-09-2003
			DE 50104979 D1	03-02-2005
			WO 0204924 A1	17-01-2002
			EP 1299707 A1	09-04-2003
			JP 2004503223 T	05-02-2004
			US 2004048330 A1	11-03-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014542

A. KLASSTFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N15/14

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BRINKMANN MARLIES ET AL: "New technologies for automated cell counting based on optical image analysis 'The Cellscreen'." CYTOTECHNOLOGY, Bd. 38, Nr. 1-3, 2002, Seiten 119-127, XP002328794 ISSN: 0920-9069	1, 3, 5, 8-22
Y	Zusammenfassung; Abbildung 1	2, 4
Y	US 2003/092058 A1 (SPAULDING GLENN F) 15. Mai 2003 (2003-05-15) Absätze '0011!', '0018!', '0024!; Abbildung 1	2, 4
	----- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Mai 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

01/06/2005

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/014542

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 319 468 B1 (SHEPPARD, JR. NORMAN F ET AL) 20. November 2001 (2001-11-20)	1,7,20
Y	Spalte 1, Zeilen 38-53 Spalte 5, Zeile 66 - Spalte 6, Zeile 67 Spalte 9, Zeilen 26-46 Spalte 14, Zeilen 44-53; Abbildung 6A	5,6
Y	YANG J ET AL: "CELL SEPARATION ON MICROFABRICATED ELECTRODES USING DIELECTROPHORETIC/GRAVITATIONAL FIELD-FLOW FRACTIONATION" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, US, Bd. 71, Nr. 5, 1. März 1999 (1999-03-01), Seiten 911-918, XP000825768 ISSN: 0003-2700 Seite 913, rechte Spalte, Absatz 2 - Seite 915, linke Spalte, Absatz 2; Abbildung 2	5,6
A	WO 02/04924 A (INNOVATIS GMBH; BITTNER, CHRISTOPH) 17. Januar 2002 (2002-01-17) Seite 1, Spalte 34 - Seite 2, Spalte 24 Seite 6, Spalten 13-21	1-22

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/014542

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2003092058 A1	15-05-2003	KEINE	
US 6319468 B1	20-11-2001	US 6143247 A	07-11-2000
		US 6319469 B1	20-11-2001
		US 2004142494 A1	22-07-2004
		US 2002076804 A1	20-06-2002
		US 2005069913 A1	31-03-2005
		US 2002137218 A1	26-09-2002
		AU 5895898 A	17-07-1998
		WO 9828623 A1	02-07-1998
		AU 5386996 A	23-10-1996
		CA 2217572 A1	10-10-1996
		EP 0827511 A1	11-03-1998
		JP 11504316 T	20-04-1999
		WO 9631537 A1	10-10-1996
		US 5891341 A	06-04-1999
WO 0204924 A	17-01-2002	DE 10033268 A1	07-02-2002
		AT 286247 T	15-01-2005
		AU 8393401 A	21-01-2002
		CN 1441899 A ,C	10-09-2003
		DE 50104979 D1	03-02-2005
		WO 0204924 A1	17-01-2002
		EP 1299707 A1	09-04-2003
		JP 2004503223 T	05-02-2004
		US 2004048330 A1	11-03-2004